

襄阳地区高温大曲发酵过程中细菌群落演替与功能预测分析

赵慧君^{1,2,3}, 易宗伟^{1,2,3}, 王玉荣^{1,2,3}, 倪慧², 叶明波³, 郭壮^{1,2,3}, 侯强川^{1,2,3*}

(1. 湖北文理学院, 湖北省食品配料工程技术研究中心, 湖北襄阳 441053)(2. 襄阳市酱香型白酒固态发酵企校联合创新中心, 酱香型白酒固态发酵襄阳市重点实验室, 湖北襄阳 441053)(3. 襄阳市酱香型白酒生态酿造企校联合创新中心, 湖北襄阳 441053)

摘要: 该研究以采集的 32 份不同发酵时期高温大曲作为研究对象, 采用 16S rRNA 测序技术对高温大曲发酵过程中细菌群落多样性进行了解析, 并结合 PICRUSt 软件对细菌基因功能进行了预测。研究结果显示, 不同发酵时期高温大曲细菌丰富度和群落结构差异显著 ($P<0.05$), 且随着发酵的进行, 细菌丰富度呈现先上升后下降的趋势, 在一次翻曲时达到最高。高温大曲发酵过程中共检测到 3 个优势细菌门和 10 个优势细菌属, 在不同发酵时期样品中具有明显的群落演替, 同时从所有样品中共检测到 10 个核心 OTU, 主要隶属于糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*)、高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、克罗彭斯特菌属 (*Kroppenstedtia*) 和慢生芽孢杆菌属 (*Lentibacillus*), 累积平均相对含量为 52.62%。不同发酵时期高温大曲之间细菌微生物网络存在明显差异, 其中一次翻曲样品的细菌群落复杂性较高且连通性较好, 且岩石芽孢杆菌属 (*Scopulibacillus*) 和 *Bacillus* 是维持高温大曲发酵过程中微生物群落结构稳定的关键细菌属。新陈代谢是高温大曲发酵过程中的重要功能通路, 包括能源生产和转化以及氨基酸、碳水化合物、脂质等生物大分子运输和代谢。该研究强化了人们对高温大曲发酵过程中细菌群落演替的认识, 同时为相关企业制曲工艺的优化和产品品质的改善提供了有益参考。

关键词: 不同发酵时期; 高温大曲; 细菌群落; 共现性网络; 基因功能预测

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.2.1609

Bacterial Community Succession and PICRUSt Predictive Analysis of Gene Function during High-temperature *Daqu* Fermentation Process in Xiangyang Region

ZHAO Huijun^{1,2,3}, YI Zongwei^{1,2,3}, WANG Yurong^{1,2,3}, NI Hui², YE Mingbo³, GUO Zhuang^{1,2,3},
HOU Qiangchuan^{1,2,3*}

(1.Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Ingredients, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China)(2.Xiangyang Jiangxiang Baijiu Solid State Fermentation Enterprise-School Joint Innovation Center, Xiangyang Key Laboratory of Solid State Fermentation of Jiangxiang Baijiu, Xiangyang 441053, China)(3.Xiangyang Jiangxiang Baijiu Ecological Brewing Enterprise-School Joint Innovation Center, Xiangyang 441053, China)

Abstract: In this study, 32 samples of high-temperature *Daqu* at different fermentation periods were collected as research objects. 16S rRNA sequencing technology was used to analyze the bacterial community diversity during the high-temperature *Daqu* fermentation process, and the bacterial gene function was predicted by PICRUSt software. The results showed that the bacterial richness and community structure of high-temperature *Daqu* at different fermentation periods were significantly different ($P<0.05$). With the progress of fermentation, the bacterial richness showed a trend of first increasing and then decreasing, and reached the highest at the first-turned *Daqu*. A total of 3 dominant bacterial phyla and 10 dominant bacterial genera were detected during the high-temperature *Daqu* fermentation process, and there was obvious

收稿日期: 2024-10-29; 修回日期: 2024-12-07; 接受日期: 2024-12-10

基金项目: 湖北省自然科学基金计划青年项目 (2023AFB288); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目 (T2023022)

作者简介: 赵慧君 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: lamb1129@163.com

通讯作者: 侯强川 (1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: houqiangchuan@163.com

community succession in the samples at different fermentation stages. At the same time, a total of 10 core OTUs were detected from all samples, mainly belonging to *Saccharopolyspora*, *Thermoactinomyces*, *Bacillus*, *Kroppenstedtia* and *Lentibacillus*, with cumulative average relative abundance of 52.62%. There were significant differences in bacterial microbial networks of high-temperature *Daqu* between different fermentation periods. Among them, the community structure of the first-turned *Daqu* samples was more complex and had more connectivity, and *Scopulibacillus* and *Bacillus* were the key bacteria to maintain the stability of the microbial community structure during the high-temperature *Daqu* fermentation process. Metabolism was an important functional pathway in the high-temperature *Daqu* fermentation process, including energy production and transformation, as well as the transport and metabolism of biological macromolecules such as amino acids, carbohydrates and lipids. This study strengthens people's understanding of the succession of bacterial communities during the high-temperature *Daqu* fermentation process, and provides a useful reference for the optimization of *Daqu* making process and the improvement of product quality in related enterprises.

Keywords: different fermentation periods; high-temperature *Daqu*; bacterial community; Co-occurrence network; gene function prediction

酱香型白酒作为我国十二大香型白酒之一,具有“醇厚细腻、回味悠长、空杯留香”等特点,其销量在同等级产品中长期占据领先地位。作为酱香型白酒酿造使用的唯一糖化发酵剂,高温大曲是典型的酱香型大曲,富含丰富的微生物和风味物质,对大曲的质量以及白酒的产量、品质和酒体风格具有直接而深远的影响,且成品曲的香气是白酒酱香风味的主要来源之一^[1]。因此,现如今对高温大曲发酵过程中微生物群落演替的探究已成为酱香型白酒领域的主要研究热点之一,以期通过有效控制大曲生产性能来提升产品质量和改善白酒风味。其中,大曲来源的细菌微生物对白酒酿造过程中发酵原料的降解、风味代谢物的积累和出酒率的提高等多个过程具有至关重要的作用^[2]。例如,隶属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)的微生物可以分泌多种水解酶类,将淀粉、蛋白质等分解成氨基酸等小分子物质,经过一系列代谢反应可以产生吡嗪、有机酸类及芳香族类等对白酒的风味具有重要作用的物质^[3],且已被证明在强化大曲中添加该菌株是提高白酒出酒率的有效手段之一^[4],而隶属于高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)的大多数微生物能代谢产生蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等多种酶和风味取值及其前体成分,是酱香型白酒酿造过程中一类具有重要应用潜力的细菌微生物资源^[5]。由此可见,探究高温大曲发酵过程中细菌多样性和群落演替对于酱香型白酒产业的发展具有举足轻重的作用。

高温大曲的制作主要涉及到入房、第一次翻曲、第二次翻曲和出房4个关键控制节点^[6],工人通过反复开闭门窗、翻动曲块和揭盖稻草等操作有效控制曲房内发酵顶温、湿度、氧浓度等环境条件,进而影响大曲中微生物的生长和代谢以及相关功能酶和风味物质的积累^[7]。进去曲房初期,曲块内各种微生物开始大量繁殖并释放热量,导致曲房内温度上升、湿度下降、氧含量降低等,部分微生物生长和代谢受到抑制;发酵8~10d后,曲房内温度有所降低,空间范围内氧气浓度升高并通过人工洒水使湿度上升,微生物在适宜的环境条件下大量生长繁殖,进行第一次翻曲;第一次翻曲后6~8d左右,曲房内温度、湿度和氧含量的变化促进了微生物繁殖并代谢各种酶类,有利于分解大分子物质代谢合成风味化合物,进行第二次翻曲;发酵至40d之后,曲房内温度接近室温,大部分曲块已趋于干燥,即可拆曲出房。先前已有研究证实,黑色高温大曲在4个关键制曲节点的微生物群落结构存在较大差异,除*Bacillus*和嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)外,其余微生物属均出现极为剧烈的演替现象^[6]。

结合实际生产工艺的关键控制节点,本研究对入房阶段、一次翻曲、二次翻曲和拆曲出房4个节点的高温大曲进行了取样,采用高通量测序技术解析了高温大曲发酵过程中细菌多样性和群落演替,并结合PICRUSt软件预测了细菌基因功能。本研究将有助于人们深化对高温大曲发酵过程中的细菌类群和群落特征演变的认识,同时为强化大曲发酵人工调控技术以及酱香型白酒产业发展提供新的见解。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高温大曲样品,由湖北省襄阳市某酱香型白酒有限公司提供,该公司是襄阳地区生产酱香型白酒的代表性公司。

QIAGEN DNeasy mericon Food Kit DNA基因组提取试剂盒,德国QIAGEN公司;5×TransStart™ FastPfu

Buffer、dNTPs Mix 和 FastPfu Buffer, 北京全式金生物技术有限公司; 引物 338F/806R (338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'; 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 武汉天一辉远生物科技有限公司合成。

1.2 仪器与设备

800Y 粉碎机, 永康市铂欧五金制品有限公司; 5810R 型离心机 (冷冻型), 德国 Eppendorf 公司; Veriti FAST 梯度 PCR 仪, 美国 ABI 公司; ND-2000C 微量紫外分光光度计, 美国 Thermo 公司; DYY-12 型电泳仪, 北京六一仪器厂; Fluor Chem FC3 化学发光凝胶成像系统, 美国 Protein Simple 公司; R930 型机架式服务器, 美国 DELL 公司; Illumina MiSeq 高通量测序平台, 美国 Illumina 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品采集

以不同发酵时期高温大曲作为研究对象, 分别于曲块入房阶段 (发酵第 0 d, D0)、一次翻曲 (发酵第 9 d, D9)、二次翻曲 (发酵第 16 d, D16) 和拆曲出房 (发酵第 44 d, D44) 时进行取样。选择同一发酵批次且置于同一曲房的大曲样品, 在曲房的四个位置分别采集 2 份曲块, 每个时期共计 8 份大曲样品, 经过粉碎、混匀和过筛后装入无菌自封袋中, 并置于低温采样箱中迅速带回实验室进行分析。

1.3.2 宏基因组 DNA 提取、PCR 扩增及 16S rRNA 测序

使用宏基因组 DNA 提取试剂盒对不同发酵时期高温大曲样品中细菌微生物的宏基因组 DNA 进行提取, 并使用通用引物 338F/806R 扩增 16S rRNA 的 V₃~V₄ 区域^[8]。之后使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测, 并使用微量紫外分光光度计检测 PCR 产物的浓度和纯度, 将检验合格的 PCR 扩增产物送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。

1.3.3 序列质控和生物信息学分析

使用 QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, v1.9.1) 分析平台对下机后的测序数据进行微生物多样性和群落注释分析^[9]。首先使用 FLASH 软件将质量引物的双端序列按照重叠碱基进行配对, 并根据 Barcode 标签将序列划分以得到每个样品的有效序列^[10], 使用 UCHIME 将序列中的嵌合体、标签和引物剔除, 然后使用 UCLUST 在 97% 相似度下对序列进行聚类, 获得分类操作单元 (Operational taxonomic units, OTU)^[11], 之后选取各 OTU 中代表性序列与核糖体数据库 (Ribosomal database project, RDP) 进行比对, 得到不同 OTU 的物种注释信息, 进而对微生物多样性和群落结构进行分析。

1.3.4 PICRUST 基因功能预测分析

根据代表序列注释结果, 使用 PICRUST 软件对不同发酵时期高温大曲样品中细菌微生物的基因功能进行预测, 并参照蛋白质直系同源簇数据库 (Clusters of orthologous groups of proteins, COG) 可预测基因进行功能注释^[12]。

1.4 数据分析

使用 Origin 2021 软件绘制条形图和堆积柱状图, 使用 R (v4.1.3) 软件包 “ggplot2” (v3.5.1, <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>) 绘制 PCoA 散点图, 使用 R 软件包 “UpSetR” (v1.4.0, <http://github.com/hms-dbmi/UpSetR>) 绘制 UpSet 图, 使用 R 软件包 “RColorBrewer” 绘制花瓣图 (v1.1-3, <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>), 使用 R 软件包 “waterfall” (v1.0.2, <https://github.com/howardjp/waterfall>) 绘制瀑布图, 使用 R 软件包 “WGCAN” (v1.73, <https://CRAN.R-project.org/package=WGCNA>) 和 “igraph” (v2.1.1, <https://CRAN.R-project.org/package=igraph>) 绘制共现性网络图, 使用 stst 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 高温大曲发酵过程中细菌多样性分析

本研究对采集的 32 份不同发酵时期高温大曲样品进行了 16S rRNA 测序分析, 进而解析了高温大曲发酵过程

中细菌多样性信息。所有样品测序数据经过质量控制分析共获得 1 533 778 条高质量细菌序列, 平均每份样品测得 47 930 条序列。在同一测序深度 (21 010 bp) 下对不同发酵时期高温大曲细菌微生物的 α 多样性指数进行了计算, 并基于非加权和加权 UniFrace 距离对不同发酵时期高温大曲之间细菌群落的系统发育关系远近进行了比较分析, 结果如图 1 所示。

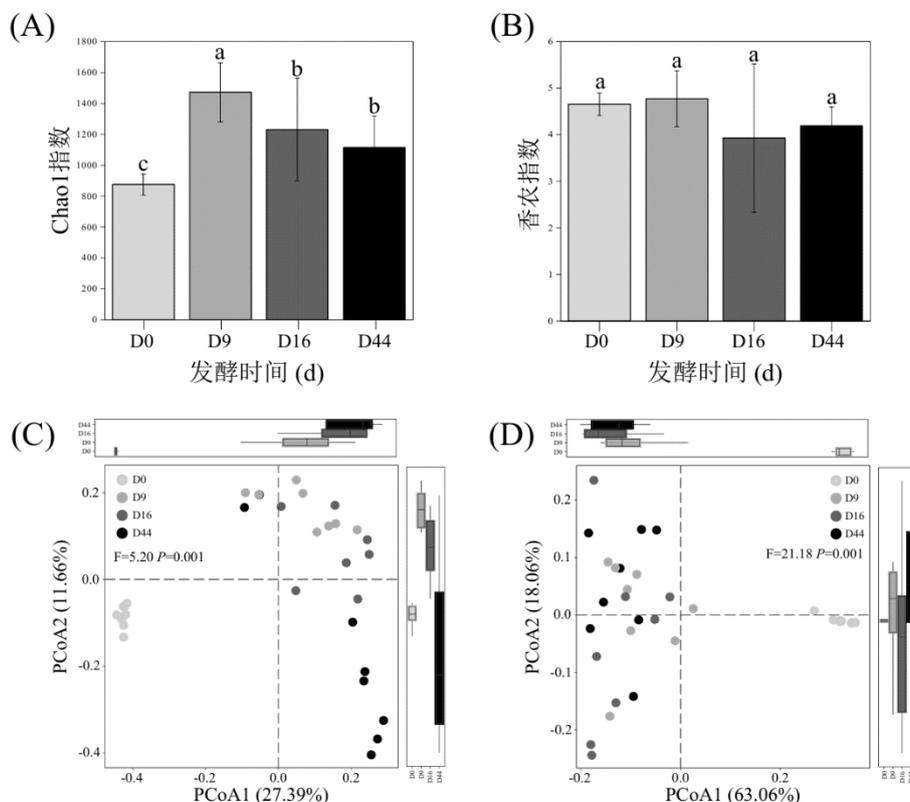


图 1 不同发酵时期高温大曲细菌微生物 α 多样性 (A 和 B) 和 β 多样性 (C 和 D) 分析

Fig.1 Analysis of α diversity (A and B) and β diversity (C and D) of bacteria community of high-temperature *Daqu* at different fermentation periods

注: 图中两组间不存在相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

由图 1A 可知, 高温大曲发酵过程中 Chao1 指数呈现先上升后下降的趋势, 且一次翻曲高温大曲样品的 Chao1 指数显著偏高 ($P < 0.05$)。由图 1B 可知, 不同发酵时期高温大曲样品的香农指数差异不显著 ($P > 0.05$)。由此可知, 高温大曲发酵过程驱动细菌丰富度演替, 且一次翻曲高温大曲样品的细菌丰富度最高。

由图 1C 可知, 基于非加权 UniFrace 距离, 不同发酵时期高温大曲样品之间的细菌群落结构存在显著差异 ($F = 5.21, P = 0.001$)。由图 1D 可知, 基于加权 UniFrace 距离, 不同发酵时期高温大曲样品之间的细菌群落结构亦存在显著差异 ($F = 21.18, P = 0.001$)。由此可知, 无论是否考虑物种丰度, 不同发酵时期高温大曲的细菌群落结构均存在显著差异, 即高丰度和低丰度菌群在不同发酵时期高温大曲之间均存在显著差异。

根据已报道的研究可知, 不同发酵阶段曲房内顶温波动可能是导致高温大曲细菌丰富度和群落结构更替的重要参数之一^[13]。高温大曲在整个发酵过程中曲房内温度呈现先上升后下降的动态变化趋势, 一次翻曲时曲房内温度可达到 60 °C 以上 (峰值), 而二次翻曲时曲房内温度可调整到 50~55 °C, 在此高温环境下可能导致曲块中微生物组成及相互作用关系发生改变, 不耐高温的微生物生长繁殖受到抑制, 嗜热微生物和耐高温微生物被富集并逐渐占据优势地位^[14], 且微生物之间相互作用强度有所调整, 从而影响高温大曲的菌群丰富度和群落结构。

2.2 高温大曲发酵过程中细菌群落结构分析

本研究在 97% 相似性阈值下对质控后的高质量序列进行了聚类分析, 共获得 5735 个 OTU。选取各 OTU 中丰度最高的序列作为代表序列并与数据库进行比对, 共鉴定到 21 个门, 53 个纲, 79 个目, 171 个科和 390 个属, 并将样品中平均相对含量大于 1% 的微生物类群定义为优势微生物类群。为了明确高温大曲发酵过程中细菌群落

结构特征, 本研究对不同发酵时期高温大曲优势细菌门和属的群落结构进行了解析, 结果如图 2 所示。

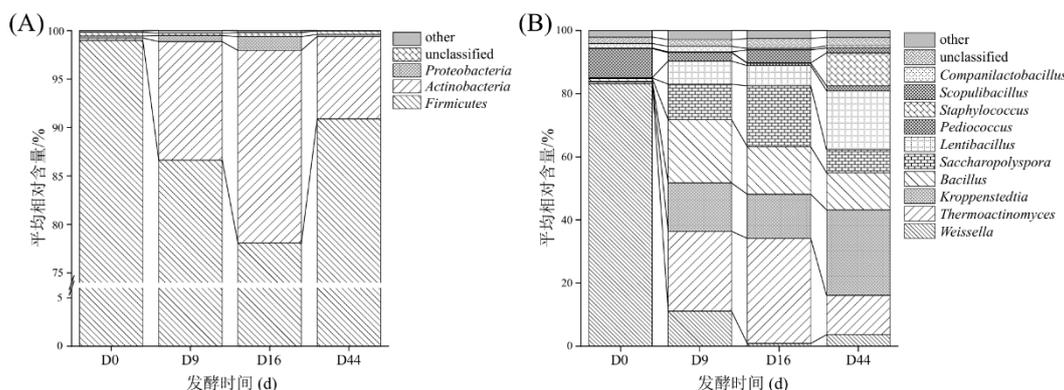


图 2 不同发酵时期高温大曲优势细菌门 (A) 和属 (B) 分析

Fig.2 Analysis of dominant bacterial phylum (A) and genus (B) of high-temperature *Daqu* at different fermentation periods

由图 2A 可知, 从 32 份不同发酵时期高温大曲样品中共检测到 3 个优势细菌门, 分别为厚壁菌门 (*Firmicutes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*)。其中 *Firmicutes* 为不同发酵时期高温大曲共有的主要优势细菌门, 平均相对含量为 78.08%~98.97%; *Actinobacteria* 为一次翻曲、二次翻曲和拆曲出房时高温大曲共有的优势细菌门, 平均相对含量依次为 12.23%、19.87%和 8.51%; *Proteobacteria* 为二次翻曲时高温大曲特有的优势细菌门, 平均相对含量为 1.42%。由图 2B 可知, 从 32 份不同发酵时期高温大曲样品中共检测到 10 个优势细菌属, 分别为魏斯氏菌属 (*Weissella*)、高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*)、克罗彭斯特德菌属 (*Kroppenstedtia*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*)、慢生芽孢杆菌属 (*Lentibacillus*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、岩石芽孢杆菌属 (*Scopulibacillus*) 和伴生乳杆菌属 (*Companilactobacillus*)。其中, *Weissella* 为入房阶段时高温大曲中主要的优势细菌属, 平均相对含量为 83.13%; *Thermoactinomyces*、*Bacillus*、*Kroppenstedtia*、*Saccharopolyspora* 和 *Weissella* 为一次翻曲时高温大曲中主要的优势细菌属, 平均相对含量依次为 25.35%、20.05%、15.28%、11.26%和 11.07%; *Thermoactinomyces*、*Saccharopolyspora*、*Bacillus* 和 *Kroppenstedtia* 为二次翻曲时高温大曲中主要的优势细菌属, 平均相对含量依次为 33.30%、19.27%、15.04%和 14.02%; *Kroppenstedtia*、*Lentibacillus*、*Thermoactinomyces*、*Bacillus* 和 *Staphylococcus* 为拆曲出房时高温大曲中主要的优势细菌属, 平均相对含量依次为 27.09%、18.76%、12.48%、11.81%和 10.50%。由此可知, 不同发酵时期高温大曲细菌丰富度和群落结构存在差异, 且具有较为明显的阶段性演替规律。

为了进一步解析高温大曲发酵过程中细菌类群, 本研究对不同发酵时期高温大曲 OTU 组成进行了分析, 并将所有样品中均存在的 OTU 定义为核心 OTU, 结果如图 3 所示。

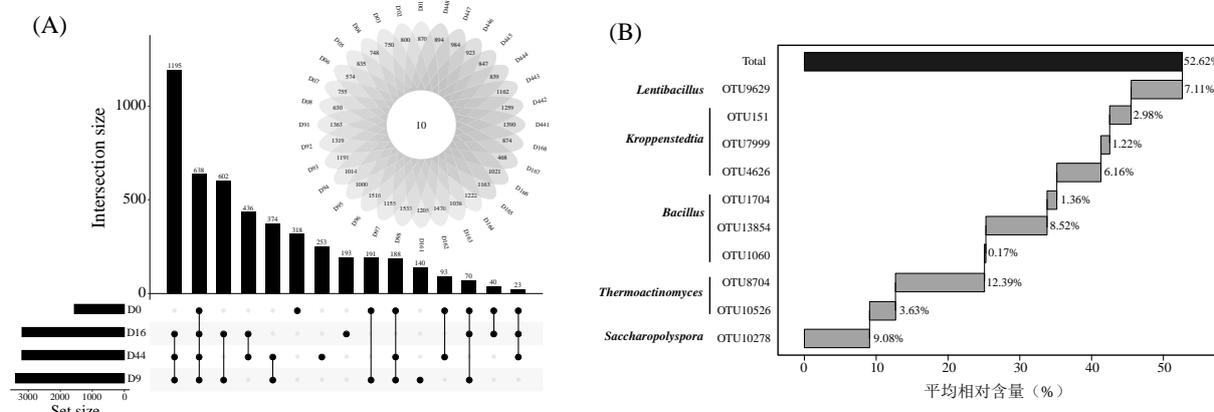


图 3 不同发酵时期高温大曲 OTU 组成 (A) 和核心 OTU (B) 分析

Fig.3 Analysis of OTU composition (A) and core OTU (B) of high-temperature *Daqu* at different fermentation periods

由图 3A 可知, 相较于入房阶段高温大曲, 一次翻曲、二次翻曲和拆曲出房时高温大曲中 OTU 数目明显偏多, 且三个时期高温大曲共有的细菌 OTU 数目为 1 195 个, 占 OTU 总数目的 20.84%, 远高于四个时期高温大曲共有

的 OTU 数目 (638 个), 这表明曲块堆积发酵过程是富集微生物的主要途径之一。此外, 入房阶段、一次翻曲、二次翻曲和拆曲出房高温大曲样品中特有细菌 OTU 数目依次为 318 个、140 个、193 个和 253 个, 分别占 OTU 总数目的 5.54%、2.44%、3.37% 和 4.11%, 这表明入房阶段和拆曲出房时高温大曲中特有的细菌类群较为丰富, 而一次翻曲和二次翻曲时高温大曲中特有的细菌类群较少。推测原因可能是, 入房阶段时高温大曲中含有大量来自制曲原料、培养环境以及曲母中的细菌微生物^[15], 随着曲房内发酵温度的升高以及湿度的降低, 大曲的发酵逐渐处于高温干燥环境中 (一次翻曲和二次翻曲), 曲块中具有高温耐受特性的微生物生长良好, 而不适宜此温度的细菌微生物可能在细胞防御机制的作用下进入休眠期甚至失去活性, 之后随着曲房内温度的降低 (接近室温), 大曲的发酵亦逐渐到达终点 (拆曲出房), 部分进入休眠期的微生物可能重新获得活性进一步生长繁殖, 这体现了环境对微生物的筛选作用。

由图 3A 亦可知, 从 32 份高温大曲中共检测到 10 个核心 OTU。基于细菌属水平对核心 OTU 进行了注释, 结果如图 3B 所示。其中, OTU10278 隶属于 *Saccharopolyspora* (9.08%), OTU10526 和 OTU8704 隶属于 *Thermoactinomyces* (16.02%), OTU1060、OTU13854 和 OTU1704 隶属于 *Bacillus* (10.05%), OTU4626、OTU7999 和 OTU151 隶属于 *Kroppenstedtia* (10.36%), OTU9629 隶属于 *Lentibacillus* (7.11%), 核心 OTU 的累积平均相对含量为 52.62%。由此可知, *Saccharopolyspora*、*Thermoactinomyces*、*Bacillus*、*Kroppenstedtia* 和 *Lentibacillus* 是高温大曲发酵过程中的核心细菌类群, 且不同发酵时期高温大曲中存在大量核心细菌类群。

综合上述分析结果可知, 纳入本研究的襄阳地区高温大曲在发酵过程中形成了以 *Thermoactinomyces*、*Bacillus*、*Kroppenstedtia* 和 *Saccharopolyspora* 为主要细菌属 (平均相对含量大于 10%) 的微生物群落结构, 这与前期高温大曲相关研究报道结果类似, 但受到多样化的发酵环境和生产原料的影响, 不同来源高温大曲发酵过程中细菌微生物群落结构亦有所不同^[14-16]。例如, 在其他生产工艺相同的情况下, 数字化管理系统生产的高温大曲和传统方式生产的高温大曲的微生物群落组成和丰度具有略微差异, 但均形成了以 *Kroppenstedtia*、*Saccharopolyspora*、*Bacillus* 和 *Weissella* 为主要菌属的细菌群落结构^[14]; 在白云边高温大曲发酵过程中, 乳杆菌属 (*Lactobacillus*, 33.0%) 在发酵初期占据绝对优势地位, *Bacillus*、*Saccharopolyspora*、*Thermoactinomyces* 和放线菌属 (*Actinomycetales*) 在发酵温度最高时累积丰度高达 96.8%, *Bacillus* (76.8%) 是成熟曲中主要优势菌属之一^[15]; 在襄阳地区不同颜色高温大曲分析中发现, 从白色、黄色到黑色高温大曲, *Bacillus* 相对含量逐渐降低, 而 *Lentibacillus* 相对含量逐渐升高^[16]。值得注意的是, *Thermoactinomyces*、*Bacillus* 和 *Kroppenstedtia* 均隶属于芽孢杆菌目 (*Bacillales*), 可以形成芽孢且具有很强的抗逆性^[17], 这可能也是导致高温大曲中这类微生物富集的重要原因之一。

Thermoactinomyces 和 *Kroppenstedtia* 的最适生长温度范围在 45~55 °C, 在适宜的高温高湿的条件下具有促进大曲内部美拉德反应和焦糖化反应产生大量黑色或深棕色化合物的作用^[18], 且 *Thermoactinomyces* 可代谢产生多种耐高温酶系, 有助于发酵原料中淀粉的液化和糖化^[19], *Kroppenstedtia* 是酱香型白酒酿造过程中脂肪酸生物合成的功能微生物^[20], 在酿酒产业中具有重要的应用价值。*Bacillus* 和 *Saccharopolyspora* 是小麦中最丰富的菌属^[21], 且 *Bacillus* 是白酒发酵过程中最重要的优势细菌属之一, 具有产生蛋白酶、糖化酶和液化酶等多种水解酶的特性, 这些酶类可以将酿酒原料中含有的淀粉、蛋白质等大分子物质水解成小分子物质, 有助于促进发酵过程的顺利进行和生物物质原料的充分利用, 并有利于改善酒体的风味特性和滋味品质^[4,6], *Saccharopolyspora* 是白酒酿造过程中产生风味物质的重要细菌属之一, 具有能够产生耐热的 α -淀粉酶将淀粉水解为葡萄糖、麦芽糖等的功能^[14], 这 2 种主要细菌属产生的酶系在高温环境下仍能保持较高的催化活性, 可以为高温大曲堆积以及白酒酿造过程提供充足的发酵动力^[22]。由此可知, 高温大曲发酵过程中的主要细菌属可以为白酒酿造提供丰富的酶系和风味物质, 有利于提升原料利用率和改善白酒质量。

2.3 高温大曲发酵过程中细菌微生物共现性网络分析

微生物之间复杂的相互作用关系在对菌群结构的稳定性以及对环境变化的抵抗力中发挥着关键作用^[23]。微生物共现模式的网络分析为复杂的微生态信息提供了一个新的可视化总结, 有助于解析高温大曲发酵过程中微生物复杂的菌群功能结构。本研究筛选出高温大曲样品中平均相对含量大于 0.01% 且出现次数大于总样本量 1/5 的 OTU 进行了 Spearman 相关系数的共现性分析 ($|r| > 0.50$, $P < 0.05$), 节点的大小与连接的边数成正比 (相关性), 节点越大代表它们与其他节点的相关性就越强, 相同颜色代表 OTU 注释结果隶属于同一细菌属, 结果如图 4 所示。

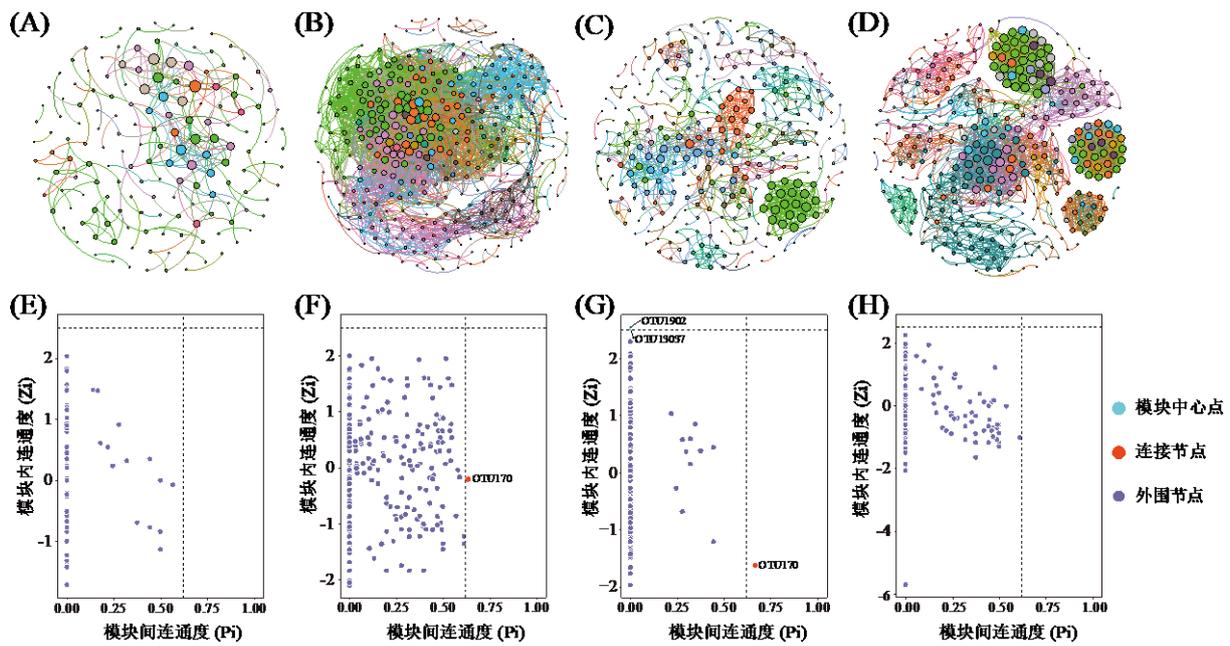


图4 不同发酵时期高温大曲细菌微生物共现性网络图 (A、B、C 和 D) 和 Zi-Pi 图 (E、F、G 和 H) 分析

Fig.4 Analysis of bacterial co-occurrence network (A, B, C and D) and Zi-Pi diagram (E, F, G and H) of high-temperature *Daqu* at different fermentation periods

注: (A) 和 (E) 代表入房阶段; (B) 和 (F) 代表一次翻曲; (C) 和 (G) 代表二次翻曲; (D) 和 (H) 代表拆曲出房。

由图 4 可知, 不同发酵时期高温大曲之间的细菌微生物网络存在明显差异。为了有效的呈现网络图的拓补结构, 本研究进一步计算了每个共现性网络图的关键拓补参数, 包括模块化指数、节点、边、平均度、平均路径长度、网络直径、图密度和平均聚类系数。如表 1 所示, 入房阶段、一次翻曲、二次翻曲和拆曲出房时高温大曲细菌微生物共现性网络的模块化指数分别为 0.779、0.376、0.883 和 0.778, 表明除了一次翻曲, 其它三个时期高温大曲细菌微生物网络均具有较高的模块化结构(模块化指数>0.4)。其中, 入房阶段、一次翻曲、二次翻曲和拆曲出房时高温大曲细菌微生物网络分别由 164、358、330 和 359 个节点以及 253、5 091、923 和 2 740 条边组成, 正相关边数占比分别为 90.12%、72.93%、97.29%和 90.04%, 均大于负相关边数, 表明不同发酵时期高温大曲中细菌微生物群落都形成了较稳定的协同关系。平均度(即所有节点的平均连接边数)和平均路径长度(即两个节点之间距离的平均值)可以有效反映网络中各节点之间相互关系的紧密程度以及分离程度, 平均度越大, 平均路径长度越小, 代表网络互作程度越高。一次翻曲时高温大曲细菌微生物网络的平均度最大(28.441), 平均路径长度最小(3.509), 且一次翻曲时高温大曲细菌微生物网络之间具有较多的节点和边, 间接表明在一次翻曲时高温大曲细菌微生物之间存在更多的未知互作关系。由此可知, 一次翻曲时高温大曲细菌微生物群落复杂性较高且连通性较好, 结合上述分析指出一次翻曲时高温大曲具有较高的细菌丰富度和多样性, 表明物种相互作用关系与微生物群落组装之间具有协同作用, 这与之前的研究结果相似, 即共现性网络复杂性和连通性的增加通过增强微生物通信(包括资源转移和信号转导)来提高微生物群落的稳定性^[24]。

表 1 不同发酵时期高温大曲共现性网络图的拓补参数

Table 1 Topological parameters of co-occurrence network diagram of high-temperature *Daqu* at different fermentation periods

拓补性质指标	D0 (入房阶段)	D9 (一次翻曲)	D16 (二次翻曲)	D44 (拆曲出房)
模块化指数	0.779	0.376	0.883	0.778
节点	164	358	330	359
边	253	5 091	923	2 740
平均度	3.085	28.441	5.594	15.265
平均路径长度	3.858	3.509	4.255	5.123
网络直径	10	11	13	14
图密度	0.019	0.08	0.017	0.043

平均聚类系数	0.507	0.593	0.621	0.678
--------	-------	-------	-------	-------

本研究进一步利用 Z_i (模块内连通度) - P_i (模块间连通度) 图确定了各个节点在共现性网络中的拓补作用, 根据 Z_i 和 P_i 的值主要将节点划分为四类^[23], 包括模块中心点(在模块内部具有高连通性的节点, $Z_i > 2.5$ 且 $P_i < 0.62$)、连接节点(在两个模块之间具有高连通性的节点, $Z_i < 2.5$ 且 $P_i > 0.62$)、网络中心点(在整个网络中具有高连通性的节点, $Z_i > 2.5$ 且 $P_i > 0.62$) 和外围节点(在模块内部和模块之间均不具有高连通性的节点, $Z_i < 2.5$ 且 $P_i < 0.62$), 其中模块中心点、连接节点和网络中心点在网络中具有高度连通性, 也被称为关键节点, 且之前的研究通常将关键节点与关键物种的生态概念联系起来^[24]。如图 4 所示, 在一次翻曲高温大曲中识别到一个连接节点(OTU170), 隶属于 *Bacteria* (细菌), 在二次翻曲高温大曲中识别到两个模块中心点(OTU1902 和 OTU13037) 和一个连接节点(OTU170), 分别隶属于 *Scopulibacillus*、*Bacillus* 和 *Bacteria*, 而在入房阶段和拆曲出房高温大曲中均没有发现模块中心点或连接节点。由此可知, *Scopulibacillus* 和 *Bacillus* 是维持高温大曲发酵过程中微生物群落结构稳定的重要关键细菌属。结合上述分析结果可知, *Scopulibacillus* 和 *Bacillus* 在高温大曲中累积平均相对含量为 13.36%, 与其它主要细菌属相比丰度偏低, 这与 Banerjee 等^[25]的研究结论类似。优势菌群通过丰度变化影响微生物菌群结构, 而关键菌群被认为是微生物群落的关键驱动力, 即使在较低丰度下也能发挥特定的构效作用^[26], 包括增强菌群活动、增加微生物多样性、影响物种相互作用以及改善产品质量等^[27-29]。杨阳等^[17]通过研究发现, 小麦原料的高粉碎度可能更有利于 *Scopulibacillus* 的生长, 表明襄阳地区高温大曲所使用的小麦原料可能具有较高的粉碎度, 这可能也是导致 *Scopulibacillus* 作为高温大曲发酵过程中重要关键细菌属的原因之一。

2.4 高温大曲发酵过程中基因功能预测分析

为了探究高温大曲发酵过程中细菌微生物通信演替情况, 本研究在对不同发酵时期高温大曲细菌类群进行分析的基础上, 进一步对其基因功能进行了预测分析, 并将细菌群落注释到的 23 个基因功能类别主要划分为 4 种功能通路, 包括细胞过程和信号、信息存储和处理、新陈代谢和其他, 结果如图 5 所示。

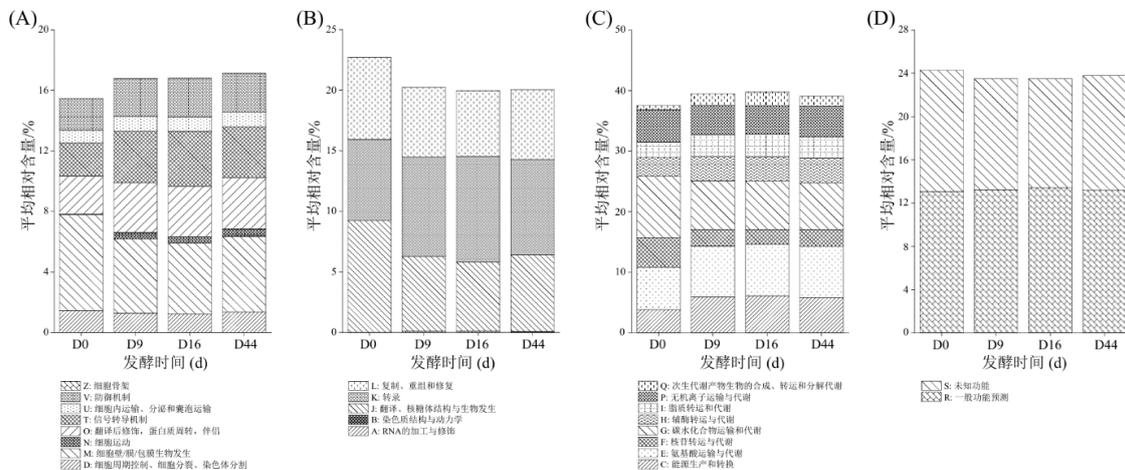


图 5 不同发酵时期高温大曲细菌序列基因功能预测分析

Fig.5 Predictive analysis of bacterial sequence gene function of high-temperature Daqu at different fermentation periods

注: (A): 细胞过程和信号; (B): 信息存储与处理; (C): 新陈代谢; (D): 其他。

由图 5 可知, 高温大曲发酵过程中不同功能通路丰度存在差异, 细胞过程和信号的累积平均相对含量为 15.45%~17.11%, 信息存储与处理的累积平均相对含量为 19.96%~22.69%, 新陈代谢的累积平均相对含量为 37.55%~39.75%, 这表明新陈代谢是高温大曲发酵过程中的重要功能通路。对不同发酵时期高温大曲细菌群落功能预测分析发现, 相较于其它发酵时期, 翻曲阶段高温大曲中与新陈代谢相关功能基因的丰度更高, 其在一二次翻曲和二次翻曲样品中的累积平均相对含量分别为 39.51% 和 39.75%, 且主要以能源生产和转化以及氨基酸、碳水化合物、脂质等生物大分子运输和代谢为主, 这表明翻曲阶段高温大曲的代谢活动较为旺盛。由此可知, 高温大曲发酵过程中细菌微生物积极参与了基本的代谢活动, 主要为发酵的进行提供能量和降解原料中的大分子物质, 且在翻曲阶段物质代谢活动最旺盛。上述分析结果揭示翻曲阶段的细菌群落为发酵的推进提供了丰富的反应底物, 且糖类和氨基酸降解后产生风味化合物如有机酸、酯类、酮类和一些挥发性酸等, 这有利于原料的充分利用和

大曲风味品质的改善,推测原因可能与这个发酵时期高温大曲中高产酶特性的细菌微生物丰度偏高且乳酸菌丰度偏低有关^[30]。不同基因编码的不同代谢通路中有不同的微生物作出贡献,不同微生物在发酵过程中形成不同的微生态环境,菌种之间的相互作用决定了产品的风味特征、活性物质等。这也使得不同发酵时期高温大曲中物种基因功能预测有所不同,导致高温大曲发酵过程中与新陈代谢相关功能基因表现出与主要细菌属类似的阶段性演替规律^[31,32]。

3 结论

细菌微生物多样性和群落结构在高温大曲发酵过程中具有明显的演替规律,形成了以 *Thermoactinomyces*、*Bacillus*、*Kroppenstedtia* 和 *Saccharopolyspora* 为主要细菌属以及 *Scopulibacillus* 和 *Bacillus* 为关键细菌属的菌群结构,与能源生产和转化以及氨基酸、碳水化合物、脂质等生物大分子运输和代谢相关功能基因在高温大曲发酵过程中具有较强的表达能力,且在翻曲阶段丰度较高。本研究为高温大曲发酵过程中细菌微生物群落演替及其基因功能预测提供了理论依据,为相关企业制曲工艺的优化和产品品质的改善提供了有益参考。此外,基于该研究结果后续可以进一步探究主要细菌属或关键细菌属的代谢通路、互作关系及其在酱酒酿造过程中的实际生产作用,以更好地指导酿酒产业的进一步发展。

参考文献

- [1] 丁润月,李姝,魏阳,等.不同颜色高温大曲形成机理及特性差异研究进展[J].食品与发酵工业,2025,51(11):376-384.
- [2] SHI W, CHAI J, ZHAO H, et al. Deciphering the effects of different types of high-temperature Daqu on the fermentation process and flavor profiles of sauce-flavor Baijiu [J]. Food Bioscience, 2024, 61: 104917.
- [3] 商海林.中高温大曲高产糖化酶及蛋白酶活力菌株的筛选与应用研究[D].济南:齐鲁工业大学,2024.
- [4] LIU Y, LI H, LIU W, et al. Bioturbation analysis of microbial communities and flavor metabolism in a high-yielding cellulase *Bacillus subtilis* biofortified Daqu [J]. Food Chemistry: X, 2024, 22: 101382.
- [5] JIN Y, LI D, AI M, et al. Correlation between volatile profiles and microbial communities: A metabolomic approach to study Jiang-flavor liquor Daqu [J]. Food Research International, 2019, 121: 422-432.
- [6] 邓阿玲,唐杰,朱楚天,等.黑色型高温大曲在固态发酵过程中的微生物群落及风味化合物演替驱动机制[J].食品科学,2024,45(23):102-112.
- [7] ZHANG C, AO Z, CHUI W, et al. Characterization of the aroma-active compounds in Daqu: a tradition Chinese liquor starter [J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(1): 69-76.
- [8] GUO Z, XIANG F, HOU Q, et al. Analysis of bacterial community structure and taste quality of different colored high-temperature Daqu in the Xiangyang region, China [J]. LWT, 2023, 188(10): 115411.
- [9] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [10] WANG Y, CAI W, WANG W, et al. Analysis of microbial diversity and functional differences in different types of high-temperature Daqu [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(2): 1003-1016.
- [11] CAI W, WANG Y, NI H, et al. Diversity of microbiota, microbial functions, and flavor in different types of low-temperature Daqu [J]. Food Research International, 2021, 150(12): 110734.
- [12] XING D, WANG H, LI S, et al. Stable isotope labeling and functional gene prediction elucidate the carbon metabolism in fermentative bacteria and microalgae coupling system [J]. Water research, 2024, 263: 122153.
- [13] 杨阳,禄凌飞,刘光钱,等.不同发酵顶温大曲中细菌群落结构的差异性分析[J].食品与发酵工业,2023,49(13):70-77.
- [14] 郑亚伦,赵婷,王家胜,等.数字化高温大曲发酵过程中微生物群落结构的变化[J].食品科学,2022,43(12):171-178.
- [15] HU Y, DUN Y, LI S, et al. Changes in microbial community during fermentation of high-temperature Daqu used in the production of Chinese 'Baiyunbian' liquor [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2017, 123(4): 594-599.
- [16] GUO Z, XIANG F, HOU Q, et al. Analysis of bacterial community structure and taste quality of different colored high-temperature Daqu in the Xiangyang region, China [J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 188: 115411.
- [17] 杨阳,张芮,于惠,等.不同粉碎度小麦发酵高温大曲的微生物群落结构及功能特征比较[J].现代食品科技,2024,40(7):72-80.

- [18] DENG L, MAO X, LIU D, et al. Comparative analysis of physicochemical properties and microbial composition in high-temperature Daqu With different colors [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 588117.
- [19] 张天震,孙晓琪,刘丹彤,等.山西老陈醋大曲细菌群落结构及多样性研究[J].*中国食品学报*,2021,21(5):323-330.
- [20] ZHANG J, DU R, NIU J, et al. Daqu and environmental microbiota regulate fatty acid biosynthesis via driving the core microbiota in soy sauce aroma type liquor fermentation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 408: 110423.
- [21] GUAN Z, ZHANG Z, CAO Y, et al. Analysis and comparison of bacterial communities in two types of 'wheat Qu', the starter culture of Shaoxing rice wine, using nested PCR-DGGE [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2012, 118(1): 127-132.
- [22] ZHU Q, CHEN L, PENG Z, et al. Analysis of environmental driving factors on core functional community during Daqu fermentation [J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111286.
- [23] WANG Y, ZHANG Z, KANG J, et al. Phages in different habitats and their ability to carry antibiotic resistance genes [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 469: 133941.
- [24] BANERJEE S, SCHLAEPPI K, VAN DER HEIJDEN M. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16: 567-576.
- [25] MOUGI A, KONDOH M. Diversity of Interaction types and ecological community stability [J]. *Science*, 2012, 337(6092): 349-351.
- [26] STEELE J, COUNTWAY P, XIA L, et al. Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages [J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(9): 1414-1425.
- [27] PENG Q, ZHENG H, QUAN L, et al. Development of a flavor-oriented synthetic microbial community for pour-over rice wine: A comprehensive microbial community analysis [J]. *Food Microbiology*, 2025, 126: 104677.
- [28] YAN Y, SUN R, YANG D, et al. Comprehensive analysis of the metabolism of core microorganisms in polyphenolic compound formation during the acetic acid fermentation stage of millet vinegar [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2024, 11: 14026.
- [29] WENG Y, CHEN L, KUN J, et al. The unique aroma of ripened Pu-erh tea, Liupao tea and Tietban tea: Associated post-fermentation condition and dominant microorganism with key aroma-active compound [J]. *Food Chemistry*, 2024, 464: 141788.
- [30] ZHU C, CHENG Y, SHI Q, et al. Metagenomic analyses reveal microbial communities and functional differences between Daqu from seven provinces [J]. *Food Research International*, 2023, 172: 113076.
- [31] 郝卓莉.遂宁榨菜发酵过程中细菌群落多样性和基因功能预测分析[J].*中国酿造*,2021,40(5):59-64.
- [32] 孙静,杨雪,彭旭,等.鸭蛋及黑黄咸蛋壳外细菌多样性及 PICRUSt 基因功能预测分析[J].*食品科学*,2023,44(14):116-124.